Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Prof. Dr. F. Haffner

Zur Beeinflussung der Färbbarkeit von Zellen durch physikalische und chemische Einwirkungen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin,
Chirurgie und Geburtshilfe
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Kurt Spring
aus Buffalo

Druck: Union Druckerei GmbH. Stuttgart 1940

Dekan: Professor Dr. Haffner

Berichterstatter: Professor Dr. Haffner

Zum Druck genehmigt von der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Zur Beeinflussung der Färbbarkeit von Zellen durch physikalische und chemische Einwirkungen

Die Färbbarkeit der Zelle ist, wie man weiß, grundsätzlich abhängig von den physikalisch-chemischen und chemischen Eigenschaften des Farbstoffes, durch die seine lösungsartige oder adsorptive oder vielleicht auch einmal seine durch echte chemische Bindung verursachte Anhäufung in oder an bestimmten Strukturteilen der Zelle bedingt wird. Auf solchen Beziehungen beruht die bunte Färbung bei der üblichen histologischen Methode am fixierten Gewebe, wie auch die noch wählerischere Färbung im Vitalfärbungsversuch. Wie schon aus diesem Unterschied des Färbeverhaltens fixierter und lebender Zellen hervorgeht, wie außerdem aus mannigfaltigen Beobachtungen über das Färbeverhalten pathologisch veränderter Gewebe zu schließen ist, hat für das Färbeergebnis auch der jeweilige Zustand des Substrats entscheidende Bedeutung. Abweichungen in der Färbung lassen daher Rückschlüsse auf die an dem Substrat eingetretene Zustandsänderung zu. Genauere Aussagen über solche Zustandsänderungen sind allerdings bisher erst in wenigen Fällen möglich; um hierin weiter zu kommen, wird es notwendig sein, systematische Untersuchungen durch experimentelle, in ihren Effekten übersehbare Einwirkungen auf die Zellen anzustellen. Im Folgenden werden Versuche in dieser Richtung mitgeteilt, die an Hefezellen (Bäckerhefe), sowie an roten und weißen Blutkörperchen durchgeführt wurden. Die Versuche wurden sowohl an lebenden bzw. überlebenden, wie an abgetöteten Zellen vorgenommen. Es kam eine Reihe verschiedenartiger Farbstoffe zur Anwendung; besonders eingehend wurde die Färbung mit dem basischen Farbstoff Methylenblau, dem sauren Farbstoff Eosin, dem Vitalfarbstoff Trypanblau und den Indikatoren Neutralrot und Bromthymolblau vorgenommen. Als Agenzien zur Beeinflussung der Zellen kamen zur Anwendung: „längeres" Überleben, Hitze, verschiedene Konzentrationen von Alkohol, Narkotika, Sublimat, Tannin, Phenol, Formalin, Säure, Lauge u. a.

I. Versuche an Hefe

1. Färbung unbehandelter Hefezellen in Kochsalzlösung

Das Färbeverhalten der Bäckerhefe wurde zunächst in der Weise geprüft, daß frische Hefe mit 0,9%iger Kochsalzlösung zu einer 1—10%igen Suspension verrührt und darauf mit wäßrigen Farblösungen versetzt wurde. Es wurden folgende Farblösungen angewandt:

Methylenblau, Methylviolett, Nilblau, Neutralrot,
Cyanin B, Eosin, Rose bengale, Trypanblau,
Kongorot, Methylrot, Bromthymolblau,
Bromkresolpurpur, Indigokarmin, Prontosil,
Kresolrot, Phenolrot, sulfosaures Natrium-Alizarin.

Die Konzentrationen variierten dabei in der Hefesuspension von 1 : 100 bis 1 : 1 000 000, gewöhnlich jedoch zwischen 1 : 1000 und 1 : 10 000. Nach verschiedenen Zeiten wurden aus den bei Zimmertemperatur gehaltenen Hefe-Farbstofflösungen Proben zur mikroskopischen Untersuchung unter dem Deckglas entnommen. Wie vorausgeschickt werden kann, ist bei dem gut färbenden Methylenblau das endgültige Farbbild schon nach spätestens einer Viertelstunde erreicht, wenn die Konzentration 1 : 1000 bis 1 : 10 000 beträgt. Dieses Farbergebnis entspricht somit einem einigermaßen stationären Befund bei der Hefe.

Bei diesem Vorgehen finden sich in der Bäckerhefe im frischen Zustand stets einige Prozent (nie über 5%) Zellen, die sich bei Methylenblauzusatz zu einer Suspension in 0,9%iger Kochsalzlösung intensiv färben, sich meist auch durch Kleinheit und länglichovale Form von den übrigen unterscheiden und die nach der Erfahrung der Hefeforschung als tot zu gelten haben. Bei einer Methylenblaukonzentration von 1 : 1000 bis 1 : 10 000, wodurch die übrigen Zellen, selbst bei mehrstündiger Einwirkung, keine Färbung erfahren, färben sich diese toten Zellen bereits nach einer Viertelstunde in toto dunkelblau ohne daß man eine besondere Differenzierung erkennen kann. Bei einer Methylenblaukonzentration von 1 : 100 000 und darunter ist nach einigen Stunden Farbeinwirkung noch keine deutliche Färbung zu erkennen.

Dieselben Zellen färben sich unter den gleichen Bedingungen ebenfalls intensiv mit:

Trypanblau (1 : 1000): dunkelblau bis schwarzblau,
Bromthymolblau (1 : 2000): satt gelb,
Kongorot (1 : 1000): satt rostbraun;

deutlich, aber weniger intensiv, färben:

Eosin (1 : 1000): rosa,
Neutralrot (1 : 10 000): weinrot,
Bromkresolpurpur (1 : 10 000): hellgelb,
Kresolrot (1 : 10 000): schwach gelb;

nicht merklich färben:

Indigokarmin (1 : 1000), Cyanin B (1 : 10 000),
Methylrot (1 : 10 000), Phenolrot (1 : 10 000),
Prontosil (1 : 10 000).

Grob giftige Farbstoffe wie Methylviolett, Nilblau und Rose bengale färben in den von uns angewandten Konzentrationen mehr Zellen als die übrigen oben erwähnten Farbstoffe; wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine Schädigung der Zellen durch den Farbstoff. Man findet dabei Unterschiede in der Färbungsintensität: einzelne, wohl die von vornherein toten, sind dunkler, die übrigen Zellen heller gefärbt:

Methylviolett (1 : 10 000): grauviolett und heller,
Nilblau (1 : 10 000): fliegerblau und bläulich,
Rose bengale (1 : 10 000): satt rot und hellrot.

2. Färbung abgetöteter Hefezellen in Kochsalzlösung

Wie die von vornherein in der Bäckerhefe sich findenden toten Zellen verhalten sich gegenüber den angewandten Farbstoffen und Konzentrationen die Gesamtheit der Zellen

a) nach kurzem Aufkochen einer Kochsalzsuspension in vitro (mit allen oben genannten Farbstoffen);

b) nach mehrstündiger Einwirkung von Alkohol, ab etwa 50% aufwärts
(mit Methylenblau, Eosin, Trypanblau und Bromthymolblau, je 1 : 1000, nach Abzentrifugieren des Alkohols);

— Färbung bei gleichzeitiger Anwesenheit von Alkohol über 50% hemmt oder verhindert die Farbstoffaufnahme —

c) nach eintägigem Aufenthalt in gesättigter Chloroformlösung und nachfolgender Waschung
(mit den gleichen Farbstoffen und Konzentrationen wie unter b);

d) nach etwa eintägiger Einwirkung von Sublimat (1 : 10 000) und nachfolgender Waschung
(mit den gleichen Farbstoffen und Konzentrationen wie unter b).

Bei Anwendung der Farbstoffkonzentration 1 : 10 000 tritt dagegen unter den angegebenen Bedingungen nur eine wesentlich schwächere Färbung ein, bei der gleichzeitig die sonst totale Färbung der Zelle sich mehr in Form einer granulären Färbung darstellt und vor allem die Vakuole besonders geringe Färbung erkennen läßt.

3. Färbeverhalten der Hefe bei „nichtfixierenden" Gifteinwirkungen

Bei weniger starken Einwirkungen zeigen die Zellen keine durchgängige Färbung; man beobachtet jedoch eine fortschreitende Vermehrung der Zahl „toter" Zellen. Untersucht wurden in dieser Beziehung folgende Agenzien, wobei die Färbung jeweils nach Auszentrifugieren der Zellen wie bei der frischen Hefe vorgenommen wurde:

a) Alkohol 20—40%
(bei 5 und 10% keine Vermehrung gefärbter Zellen)
nach 10stündiger Einwirkung
(mit Methylenblau, Eosin, Trypanblau und Bromthymolblau, je 1 : 10 000);

b) Chloralhydrat 10%
nach $^1/_2$stündiger Einwirkung
(mit Methylenblau 1 : 1000).

Bei schwachen Konzentrationen von 1% abwärts und dauernder Einwirkung ist mit Methylenblau 1 : 1000 nach 7 und 24 Stunden keine nennenswerte Vermehrung gefärbter Zellen zu beobachten.

c) Sublimat.

Während bei einer Konzentration von 1 : 100 000 fast ein Drittel aller Zellen nach etwa halbtägiger Einwirkung bei Methylenblaufärbung

1 : 1000 gefärbt sind, treten unter den gleichen Bedingungen bei der dreifach schwächeren Sublimatkonzentration (1 : 300 000) nur noch etliche blaue Zellen auf. Bei der Konzentration 1 : 1 000 000 liegen die Verhältnisse ähnlich wie bei der unbehandelten Kochsalzhefe.

d) Salzsäure.

Bei 10 Minuten langer Einwirkung von n/1-molar-Salzsäure und Färbung mit Methylenblau, Eosin, Trypanblau und Bromthymolblau, je 1 : 10 000, finden sich bei den drei letzteren Farbstoffen einzelne gefärbte Zellen, während bei Methylenblau keine Zellfärbung wahrzunehmen ist. Mehrmaliges Waschen der gleichen Zellen nach drei Tagen mit 0,9%iger Kochsalzlösung und nochmaliges Färben mit denselben Farbstoffen bei gleicher Konzentration ergibt nunmehr Färbung etwa eines Drittels der Zellen bei Methylenblau und Trypanblau, der Hälfte bei Bromthymolblau und aller Zellen bei Eosin.

Bei 10 Minuten langer Einwirkung von n/6-Salzsäure und Färbung mit Methylenblau 1 : 1000 sind nur einzelne aquamarinblaue Zellen zu finden.

Bei dauernder Einwirkung schwächerer Konzentrationen von Salzsäure und bei Methylenblaufärbung 1 : 1000 sind bei n/10-Säure nach 9 und 24 Stunden etliche, bei noch schwächerer Konzentration (n/60 Mol) nur noch einzelne Zellen, entsprechend dem Vorkommen bei nicht vorbehandelter Kochsalzhefe, festzustellen.

e) Natronlauge.

10 Minuten lange Einwirkung von n/1-molar-Natronlauge, nachfolgender Entfernung des Agens und Färbung mit Methylenblau, Eosin, Trypanblau und Bromthymolblau, je 1 : 1000, ergibt bei Methylenblau fliegerblaue Färbung aller Zellen, bei den anderen drei Farbstoffen dagegen keine Färbung. Die gleichen Zellen, nach 3 Tagen mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen und mit denselben Farbstoffen bei gleicher Konzentration nachgefärbt, zeigen nunmehr durchweg Färbung.

10 Minuten lange Einwirkung von n/6-Lauge und anschließende Färbung mit Methylenblau 1 : 1000 (nach Abgießen des Agens) hat zur Folge, daß sich alle Zellen dunkelblau färben.

Bei dauernder Einwirkung schwächerer Laugenkonzentrationen, wie etwa n/10 Mol, färben sich ebenfalls noch sämtliche Zellen, wenn auch nur hellgrünlich oder sehr hellblau (bei Methylenblaufärbung 1 : 1000) nach 8 und 24 Stunden. Der Ansatz mit n/60-Lauge zeigte nach 8 Stun-

den bei gleichem Vorgehen etliche hellgrünliche und hellblaue und wenige dunkler hellblaue Zellen, nach 24 Stunden ein Drittel aller Zellen hellblau gefärbt.

f) Trocknung bei 37° C.

Im Brutschrank getrocknete Hefesuspension wurde mit 0,9%iger Kochsalzlösung aufgeschwemmt und mit Methylenblau, Eosin und Trypanblau in der Konzentration 1 : 30 000 gefärbt. Dabei färbten sich mit Methylenblau ein Drittel bis die Hälfte aller Zellen aquamarinfarben, mit Eosin nur einzelne schwach rosa, während sich mit Trypanblau gut die Hälfte fliegerblaugrau färbte.

g) Trocknung an der Luft bei Zimmertemperatur.

An der Luft bei Zimmertemperatur getrocknete Hefe wurde mit isotonischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt und unter den gleichen Färbebedingungen wie oben untersucht. Hierbei ergaben sich parallele Befunde wie bei den bei 37° getrockneten Hefezellen: etwa ein Drittel aller Zellen waren bei Methylenblau und Trypanblau aquamarinfarben, bzw. fliegerblaugrau, bei Eosin jedoch nur einzelne schwach rosa.

Keine Färbung bewirken an der Hefesuspension in Kochsalzlösung bei Methylenblaufärbung 1 : 1000 bei halb- bis eintägiger Einwirkung des Agens:

Alkoholkonzentrationen bis unter 20%,
Sublimatkonzentrationen unterhalb 1 : 300 000,
Salzsäure unterhalb n/60 Mol,
Natronlauge unterhalb n/60 Mol,
Chloralhydrat 0,03 bis 1%,
Saponin 0,15 : 1000,
Essigsäure n/60 Mol,
Kalziumchlorid etwa 1%,
Bariumchlorid etwa $^1/_3$%,
Eisenchlorid 1 : 1000,
Silbernitrat $^1/_3$%,
Jodlösung ungefähr n/1000 Mol,
Tannin bis 10% (trotz starker Agglutination der Zellen).

Die bei Tannin angewandten Konzentrationen müssen nach sonstiger Erfahrung als unbedingt zellschädigend, bzw. zelltötend gelten. Es gibt somit zellschädigende Agenzien, bzw. Arten des Zelltodes, die zu keiner

Färbbarkeit der Zellen führen, ohne daß der Grund für die Nichtfärbbarkeit, etwa wie bei längerer Einwirkung höherer Konzentrationen von Säure und Lauge in einem Abbau oder Herauslösung des färbbaren Substrats aus der Zelle, erklärlich erscheint.

Auch unter den Agenzien, die bei höherer Konzentration Färbung herbeiführen, bestehen Konzentrationen, die keine Färbung bewirken, obwohl sie nach der sonstigen Erfahrung irreversible Vergiftung der Zelle machen. Die Färbbarkeit der Zellen hängt somit von einer ganz bestimmten Veränderung ihrer Bestandteile, wahrscheinlich einer Verdichtung, ab und kann deshalb noch nicht als Indikator irgendeiner Zellschädigung angesehen und benützt werden.

4. Färbeverhalten unter physiologischen Bedingungen

Außer der Einwirkung der verschiedenen Agenzien wurde auch das Färbeverhalten unter mehr physiologischen Bedingungen untersucht.

a) Aufbewahrung bei Zimmertemperatur

1. 1%ige Hefesuspension in 0,9%iger Kochsalzlösung.

Nach 4 Tagen wurde bei nachträglicher Färbung mit Methylenblau, Eosin, Trypanblau und Bromthymolblau, je 1 : 1000, nur eine geringe Zunahme gefärbter Zellen festgestellt. Die Färbung entsprach derjenigen toter Zellen.

2. 1%ige Hefesuspension in 10%iger Rohrzuckerlösung.

Die Färbung war nach etwa eintägigem Aufenthalt in Rohrzucker gegenüber der Hefe in Kochsalzlösung intensiver und insbesondere betrug die Zahl der gefärbten Zellen — mit Ausnahme von Trypanblau (1 : 1000) mit nur etlichen dunkelblauen Zellen — die Hälfte aller Zellen. Nach 4 Tagen waren bei Methylenblau der größere Teil hellaquamarinfarben bis dunkelblau (jeweils etwa hälftig), bei Eosin fast alle schön rosa, bei Trypanblau nunmehr ein Drittel bis die Hälfte dunkelfliegerblau und bei Bromthymolblau etwa die Hälfte satt gelb gefärbt.

b) Einfluß höherer Temperatur (37° C)

1. Kochsalzhefe.

Bei Aufbewahrung der Hefezellen bei 37° wurde schon nach 1 Tag eine Zunahme der sich färbenden Zellen beobachtet. Bei Methylenblau

zeigten bereits alle Zellen azurblaue, bei Bromthymolblau etwa die Hälfte eine grünlichgelbe Färbung. Bei Eosin war nur eine geringe Vermehrung (rosa) gefärbter Zellen und bei Trypanblau keine Vermehrung festzustellen. Nach 4 Tagen war die Zahl der sich Färbenden durchweg auf die Hälfte und mehr aller Zellen erhöht; auch die Intensität der Färbung hatte zugenommen.

2. Rohrzuckerhefe.

Die eintägige Aufbewahrung bei etwa 37° in Rohrzuckerlösung äußerte sich an den Hefezellen ebenfalls in einer verstärkten Färbung, sowohl quantitativ (in bezug auf die Zahl gefärbter Zellen) als auch qualitativ (in bezug auf die Färbungsintensität). Methylenblau zeigte im mikroskopischen Gesichtsfeld etwa drei Viertel der Zellen himmelblau bis azurblau, Eosin die gleiche Zahl rosa und heller, Trypanblau nur etwa ein Drittel dunkelblau (und heller) und Bromthymolblau die Hälfte gelb gefärbt. Nach 4 Tagen waren fast alle Zellen (bei Trypanblau etwas weniger) intensiv gefärbt.

Diese raschere Färbbarkeit der in Rohrzuckerlösung befindlichen und somit tätigen Hefezellen gegenüber den nichtgärenden Zellen der Kochsalzlösung möchten wir so erklären, daß Hand in Hand mit dem mit der Tätigkeit verbundenen, erhöhten Flüssigkeitswechsel auch der Farbstoff rascher in die Zelle einzudringen vermag.

c) Einwirkungen verschiedener osmotischer Konzentrationen (von 9% NaCl bis Wasser)

Der Einfluß von Hyper- und Hypotonie hatte bei Anwendung von Methylenblaulösungen das in der folgenden Tabelle aufgeführte Ergebnis (siehe nächste Seite oben).

Wie die Tabelle zeigt, ist stärkere Hypertonie offensichtlich von geringerem zellschädigenden Einfluß als zunehmende Werte von Hypotonie. Es muß dahingestellt bleiben, ob dies bedeutet, daß die höheren Kochsalzkonzentrationen nicht schädigen oder vielleicht trotz Schädigung nur die Farbstoffaufnahme gehemmt ist.

5. Besondere Erscheinungen

Bei Methylenblau (und Methylrot) treten, sowohl bei Zimmertemperatur wie bei 37°, Entfärbungserscheinungen auf, wie sie für Methylenblau schon vielfach beobachtet und untersucht worden sind. Diese Entfärbungen zur Reduktionsform des Farbstoffs waren

Ungefährer Prozentsatz gefärbter Zellen nach Einwirkung verschiedener

NaCl-Konzentrationen

Methylenblau-Konzentration und Untersuchungszeit	9%	3%	0,9%	0,6%	0,45%	0,3%	0,1%	Aqua dest.
3 : 10 000 $^1/_2$Stunde nach Farbstoffzusatz	einzelne							deutlich vermehrt
1 : 10 000 $^1/_2$Stunde nach Farbstoffzusatz	einzelne							deutlich vermehrt
3 : 10 000 nach 4stündiger Färbung			einzelne		deutlich vermehrt			
1 : 10 000 nach 6stündiger Färbung		einzelne				1,5%		2%
3 : 10 000 nach 24stündiger Färbung	ca. 1,5%		1%	10%	15%	35%	50%	100%

besonders deutlich bei der Anwendung der schwächeren Farbstoffkonzentrationen; ihre Hemmung, bzw. ihr Ausbleiben bei höheren Farbstoffkonzentrationen beruht zum Teil wohl auf der größeren Farbstoffmenge, die reduziert, zum Teil aber auch wahrscheinlich auf einer Schädigung der Zelle durch die höhere Farbstoffkonzentration.

Die Reduktion war besonders stark in der Rohrzuckerlösung, zumal bei den auf 37° gehaltenen Hefezellen. Bemerkenswerterweise wurde sie auch bei den auf 70° erhitzten Zellen beobachtet. Dagegen unterbleibt die Reduktion bei den von vornherein toten und gut gefärbten Zellen, jedenfalls tritt sie sehr viel verzögerter ein, wie bei den sich erst nachträglich unter den gesetzten Einwirkungen färbenden Zellen.

Von der Entfärbung durch Reduktion des Farbstoffs, die sowohl an

den Zellen wie in der Lösung stattfinden kann, zu unterscheiden, ist das Verschwinden des Farbstoffes aus der Lösung durch Anlagerung an die Zellen. Sie erfolgt erklärlicherweise um so stärker, je besser der Farbstoff die Zellen färbt; doch besteht keine völlige Proportionalität zwischen aufgenommener Farbstoffmenge und dem mikroskopisch sichtbaren Färbungseffekt — abgesehen von der Komplikation durch Reduktion.

II. Versuche an Blutkörperchen

Nach Vorversuchen an Rinderblut wurde, ohne daß sich dabei auffallende Unterschiede ergeben hätten, für die Hauptversuche Kaninchenblut verwendet, das aus der Ohrvene gewonnen und entweder durch Rühren oder durch Zusatz von 0,4%igem Natriumzitrat ungerinnbar gemacht wurde. Ein Unterschied zwischen dem durch Rühren defibrinierten und durch Natriumzitrat ungerinnbar gemachten Blut konnte in besonders darauf angestellten Vergleichsversuchen nicht festgestellt werden. Das Blut wurde vor der Weiterbehandlung mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Nur bei den Ausstrichen wurde zum Teil das ungewaschene Blut (samt Plasma) verwendet; auch dabei ergab sich kein grundsätzlicher Unterschied gegenüber den gewaschenen Blutkörperchen. Soweit im folgenden nichts anderes bemerkt, sind die Versuche mit frisch entnommenem Blut angestellt. Wie aus den Ergebnissen hervorgehen wird, bewirkt schon eintägiges Stehen bei Zimmertemperatur eine deutliche Änderung im Färbeverhalten der weißen Blutkörperchen. Infolge der offenbar größeren Labilität der weißen Blutkörperchen waren mitunter trotz gut erhaltener roter Blutkörperchen keine weißen mehr zu erkennen. In anderen Fällen, in denen in den Tabellen ebenfalls keine Beobachtungen an weißen Blutkörperchen bemerkt sind, waren die Präparate nur auf rote Blutkörperchen hin untersucht worden. Die Versuche sind tabellarisch wiedergegeben.

In der Tabelle 1 a sind die Versuche so angestellt worden, daß zu den in Kochsalz (20%ig) aufgeschwemmten Blutkörperchen die wäßrigen Farbstofflösungen zugesetzt und nach den in den Tabellen angegebenen Zeiten mikroskopisch untersucht wurden.

In Tabelle 1 b wurde mit der Färbung in der gleichen Weise verfahren, nachdem die Blutkörperchen den in der Tabelle näher beschriebenen Einwirkungen ausgesetzt waren. Bei Einwirkung von chemischen Substanzen wurden die Blutkörperchen gewöhnlich jeweils vor Zugabe der Farblösungen aus der Lösung des Agens auszentrifugiert und ein- oder zweimal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen.

In Tabelle 2 a sind die Ergebnisse von Ausstrichpräparaten mit den

verschiedenen Farbstoffen enthalten. Die Ausstriche wurden in der üblichen Weise auf Objektträger hergestellt; nach Lufttrocknung wurde der Objektträger in Petrischalen in Methylalkohol 5 Minuten eingelegt und nach Verdunsten des Alkohols in wäßrige Farbstofflösungen gebracht.

Ein Unterschied zwischen Fixierung mittels Methyl- und Äthylalkohol konnte nicht beobachtet werden. Neben der Fixierung mit wäßrigen Farbstofflösungen wurden zum Vergleich auch Färbungen mit alkoholischen Lösungen angestellt, und zwar mit 50%igem Methyl- und Äthylalkohol. Es wurden außerdem zur weiteren Kontrolle auch einigemal die Färbung in der meist üblichen Weise vorgenommen, indem zur Fixierung bereits Farbstofflösungen in 96%igem Alkohol verwendet wurden.

In Tabelle 2 b sind analoge Versuche mit anderen Fällungsmitteln durchgeführt worden. Die lufttrockenen Ausstriche wurden in die wäßrigen Lösungen dieser Agenzien eingelegt, nach einer Stunde mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und darauf wie bisher der wäßrigen Farbstofflösung ausgesetzt.

1. Färbeverhalten in Aufschwemmung

a) Ohne Behandlung

Farbstoffkonzentration	Färbungszeit (Stunden)	Rote Blutkörperchen	Weiße Blutkörperchen			
			Gelapptkernige		Rundkernige	
			Kern	Plasma	Kern	Plasma
Methylenblau						
1 : 10 000	2	fast alle ungef., vereinzelt hellblau		ungefärbt		
1 : 10 000	24 fr.[1])	teils ungefärbt. teils bläulich	schollig ungefärbt, z.T. grünliche Körnelung	gequollen ungefärbt	ungefärbt	
1 : 10 000	24 alt[1])	meist ungefärbt, einige hellblau	schwach blau	ungefärbt	schwach bläulich	
1 : 10 000	48	viele bläulich	bläulich schollig	ungefärbt	ungefärbt	
1 : 5000	1	ungefärbt	—		—	
1 : 1000	1	meist ungefärbt, einzelne hellblau	gran. kleinere, hellblau		—	

[1]) fr. = frisches Blut, alt = altes Blut — = keine Zellen beobachtet

Farbstoffkonzentration	Färbungszeit (Stunden)	Rote Blutkörperchen	Weiße Blutkörperchen			
			Gelapptkernige		Rundkernige	
			Kern	Plasma	Kern	Plasma
1 : 1000	2	meist ungefärbt, einzelne hellblau	ungefärbt			
1 : 1000	24 fr.	teils ungefärbt, teils bläulich, einzelne blau	ungefärbt			
1 : 1000	24 alt	meist ungefärbt, einzelne blau	schwach blau	schwach bläulich	dunkelblau	
1 : 1000	48	überwiegend bläulich	meist ungefärbt, blaue Kernbröckel	ungefärbt	dunkelblau	blau, gequollen
Methylviolett						
1 : 5000	1	ungefärbt	—		-	
Nilblau						
1 : 5000	1	ungefärbt	-		-	
Neutralrot						
1 : 5000	1	ungefärbt	—		—	
1 : 1000	1 fr.	ungefärbt	teils weinrot, teils braun		—	
1 : 1000	1 alt	bräunlich	—		—	
1 : 1000	4	meist ungefärbt, einzelne braun	stark braun getüpfelte Zellen			
Cyanin B						
1 : 5000	1	ungefärbt			—	
Chinolinblau						
1 : 5000	4	ungefärbt	blaue, körnige Zelltrümmer			
Eosin						
1 : 10 000	20	ungefärbt	ungefärbt			
1 : 5000	1	ungefärbt	—		—	
1 : 1000	20 alt	ungefärbt	ungefärbt	große, rosa Gran. in schwach rosa Plasma	ungefärbt	
1 : 1000	24 fr.	ungefärbt	ungefärbt		ungefärbt	

Farbstoffkonzentration	Färbungszeit (Stunden)	Rote Blutkörperchen	Weiße Blutkörperchen			
			Gelapptkernige		Rundkernige	
			Kern	Plasma	Kern	Plasma
1 : 1000	24 alt	ungefärbt	Kern?	rötl. rosa Gran. in schwach rosa Plasma	meist ungefärbt, in Auflösung; einzelne groß, rund, schwach rosa	Plasma?
			rosa Zelltrümmer			
1 : 1000	48 fr.	ungefärbt, schlecht erhalten	rosa Zelltrümmer		homogen rosa	Plasma Spur rosa, teils gequollen
1 : 1000	48 alt	Hämolyse	—		—	
Rose bengale						
1 : 5000	1	ungefärbt	—		-	
Trypanblau						
1 : 5000	1	ungefärbt	—		—	
1 : 1000	1	ungefärbt	ungefärbt			
Kongorot						
1 : 5000	1	ungefärbt	—		—	
Methylrot						
1 : 5000	1	ungefärbt	—		-	
Bromthymolblau						
1 : 5000	4	ungefärbt	meist ungefärbt; einzelne große Zellen mit hellgelbem Plasma, dunkleren Granula, ungefärbten vakuolenähnlichen Gebilden (Kern?)			
1 : 1000	1	ungefärbt Blutschatten	gelb		gelb	hellgelb
Bromkresolpurpur						
1 : 5000	1	ungefärbt	—		—	
Indigokarmin						
1 : 5000	1	ungefärbt	—		—	

b) Mit Behandlung

Agens, Farbstoff	Rote Blutkörperchen	Weiße Blutkörperchen			
		Gelapptkernige		Rundkernige	
		Kern	Plasma	Kern	Plasma
Bei 37° C 24 Stunden gehalten, dann 1 Stunde bei Zimmertemperatur gefärbt					
Methylenblau 1 : 1000	ungefärbt	—		groß, blau	ungefärbt
Eosin 1 : 1000	ungefärbt	rosa Zelltrümmer		groß, dunkelrosa	rosa, gekörnt
Prim. Phosphat mol/3 auf vorher gefärbtes Blut; Beobachtung nach mehreren Stunden					
Methylenblau 1 : 1000	Hämolyse	-		—	
Neutralrot 1 : 1000	meist Blutschatten, einzelne braune Blutkörperchen	braune Zelltrümmer			
Eosin 1 : 1000	leuchtendrote Blutkörperchen	rosa Zelltrümmer			
Trypanblau 1 : 1000	Blutschatten	ungefärbt	violett, blau getüpfelt	—	
Bromthymolblau 1 : 1000	—	dunkelgelb	gelb	—	
Sekund. Phosphat mol/3 auf vorher gefärbtes Blut; Beobachtung nach mehreren Stunden					
Methylenblau 1 : 1000	ungefärbt	blaue Zelltrümmer			
Neutralrot 1 : 1000	ungefärbt	braune Zelltrümmer			
Eosin 1 : 1000	ungefärbt	einzelne Zellen mit großem rosa Kern, einzelne mit schwach rosa Plasma			
Trypanblau 1 : 1000	ungefärbt	homogen fliegerblaugrau			
Bromthymolblau 1 : 1000		gelbgrünliche Trümmerhaufen			
Alkohol. Vorbehandlung der Blutkörperchen mit Alkohol 1 Stunde; Färbung in wäßriger Lösung etwa 3 Stunden					
96%, Methylenblau 1 : 1000	klein, satt meergrünblau	-		-	
96%, Neutralrot 1 : 1000	braun	—			
96%, Eosin 1 : 1000	gelb-rot	-		—	
96%, Trypanblau 1 : 1000	fliegerblaugrau	-		-	

Agens, Farbstoff	Rote Blutkörperchen	Weiße Blutkörperchen			
		Gelapptkernige		Rundkernige	
		Kern	Plasma	Kern	Plasma
96%, Bromthymolblau 1 : 1000	gelb	—		—	
50%, Methylenblau	blaue Zelltrümmer				
50%, Eosin 1 : 1000	rosa, granulierte Zelltrümmer				
50%, Trypanblau 1 : 1000	violette, granulierte Zelltrümmer				
50%, Bromthymolblau 1 : 1000	gelbe, granulierte Zelltrümmer				

Chloroform 5%. 1 Stunde Einwirkung des Agens auf die Blutkörperchen, nach Waschen 3 Stunden Färbung

Methylenblau 1 : 1000	Haufen von blauen, groben und feinen Zelltrümmern

Phenol 2,5%. Mikroskopische Untersuchung nach 4stündiger Einwirkung und 1stündiger Färbung

Methylenblau 1 : 2000	smaragdgrün	blaue Zelltrümmer	schwach blau	blau
Neutralrot 1 : 2000	bräunlich	braune Trümmerhaufen	Spur	rötlich
Eosin 1 : 2000	gelb-rosa	rosa	rosa	ungefärbt
Trypanblau 1 : 2000	grau	ungef. Zelltrümmer	hellgrau	Spurgrau
Bromthymolblau 1 : 2000	gelb	—	ungefärbt	gelblich

Sulfosalizylsäure 10%. 1 Stunde Einwirkung des Agens, nach Waschen der Blutkörperchen 3 Stunden Färbung

Methylenblau 1 : 1000	klein, ungefärbt	—	—

Trichloressigsäure 10%. 1 Stunde Einwirkung des Agens, nach Waschen der Blutkörperchen 3 Stunden Färbung

Methylenblau 1 : 1000	Hämolyse (5 agglutin. blaue Zellen)	große, gequollene, ungefärbte Zellen Nur eine große Zelle grünblau

Tannin. 1 Stunde Einwirkung des Agens, nach Waschen der Blutkörperchen etwa 1 Stunde Färbung

0,1%, Methylenblau 1 : 2000	ungefärbt	—	dunkelblau	blau
0,1%, Eosin 1 : 2000	ungefärbt	—		—

Agens, Farbstoff	Rote Blutkörperchen	Weiße Blutkörperchen			
		Gelapptkernige		Rundkernige	
		Kern	Plasma	Kern	Plasma
0,1%, Trypanblau 1 : 2000	ungefärbt	2 blaue Zellen, groß			
0,1%, Bromthymolblau 1 : 2000	Hämolyse	—		—	
1%, Methylenblau 1 : 1000	fast alle hellgrün bis dunkelblau	—		—	
1%, 1 : 2000	Hämolyse	blaue Zelltrümmer		große helle Zellen mit blauen „Auswüchsen“	
1%, Eosin 1 : 2000	etwa d. Hälfte ungefärbt, die andere verschiedenrosa	—		—	
1%, Trypanblau 1 : 2000	ungefärbt	größere, helle Zellen mit kleinen, rundlichen, violetten „Auswüchsen“			
1%, Bromthymolblau 1 : 2000	gelb	ungefärbte, gequollene, helle Zellen			
Rizinusextrakt (20%). Etwa 3 Stunden Einwirkung des Agens, 1 Stunde Färbung					
Methylenblau 1 : 2000	ungefärbt (wenige, kleine, schlecht erhalten)	granulierte, blaue Zelltrümmer			
Neutralrot 1 : 2000		hellbraunrote Zelltrümmer			
Eosin 1 : 2000	rosa (wenige, geschrumpfte)	granulierte, rose Zelltrümmer			
Trypanblau 1 : 2000	violett (kleine, schlecht erhalten)	dunkelviolette Zelltrümmer			
Bromthymolblau 1 : 2000	gelb	gelbe Zelltrümmer			
Formalin 40%. 1 stündige Einwirkung des Agens auf die Blutkörperchen, 3 stündige Färbung					
Methylenblau 1 : 1000	Hämolyse	—		—	
Sublimat. $^1/_2$stündige Einwirkung des Agens auf die Blutkörperchen, nach Waschen 1 Stunde Färbung					
1 : 1000, Methylenblau 1 : 5000	ungefärbt	—		—	
1 : 1000		hellblaue Zelltrümmer			

Agens, Farbstoff	Rote Blutkörperchen	Weiße Blutkörperchen			
		Gelapptkernige		Rundkernige	
		Kern	Plasma	Kern	Plasma
1 : 1000, Methylviolett					
1 : 5000	ungefärbt	—		—	
1 : 1000	violett	—		—	
1 : 1000, Nilblau					
1 : 5000	Blutschatten	2 größere Zellen hellblau; violette Trümmer			
1 : 1000		dunkelviolette Zelltrümmer			
1 : 1000, Neutralrot					
1 : 5000	ungefärbt	—		—	
1 : 1000	ungefärbt	—		—	
1 : 1000, Cyanin B					
1 : 5000	ungefärbt	—		—	
1 : 1000	ungefärbt	—		—	
1 : 1000, Eosin					
1 : 5000	schwach rosa	—		—	
1 : 1000	rosa	—		—	
1 : 1000, Rose bengale					
1 : 5000	schwach weinrot	—		—	
1 : 1000	violettrot	—		—	
1 : 1000, Trypanblau					
1 : 5000	ungefärbt	—		—	
1 : 1000	hellstahlgrau	—		—	
1 : 1000, Kongorot					
1 : 5000	hellbraun	—		—	
1 : 1000	rostbraun	—		—	
1 : 1000, Methylrot					
1 : 5000	ungefärbt	—		—	
1 : 1000	ungefärbt	—		—	
1 : 1000, Bromthymolblau					
1 : 5000	Hämolyse	—		—	
1 : 1000	gelbgrünlich	—		—	
1 : 1000, Bromkresolpurpur					
1 : 5000	ungefärbt	—		—	
1 : 1000	ungefärbt	—		—	
1 : 1000, Prontosil					
1 : 5000	ungefärbt	—		—	
1 : 1000	ungefärbt	—		—	

Agens, Farbstoff		Rote Blutkörperchen	Weiße Blutkörperchen			
			Gelapptkernige		Rundkernige	
			Kern	Plasma	Kern	Plasma
1 : 1000,	Indigokarmin					
	1 : 5000	ungefärbt	—		—	
	1 : 1000	ungefärbt	—		—	
Mikroskopische Untersuchung nach 4 Stunden Einwirkung von Sublimat 1 : 200. bzw. 1 : 40 auf das Blut und 1 Stunde Färbung						
1 : 200,	Methylenblau					
	1 : 2000	ungefärbt	ungef. Zelltrümmer		blau	schwach blau
1 : 40,	Methylenblau 1 : 2000	ungefärbt	ungef. Zelltrümmer			
	Neutralrot					
1 : 200.	1 : 2000	meist ungefärbt, vereinzelt braun	braune Zelltrümmer		kastanienbraun	hellbraun
1 : 40.	1 : 2000	ungefärbt	granulierte dunkelbraune Zelltrümmer			
	Eosin					
1 : 200,	1 : 2000	hellbraun	rosa	schwach rosa, granuliert	schwach rosa	ungefärbt
1 : 40,	1 : 2000	schwach braunrosa	ungefärbt	rosa		
	Trypanblau					
1 : 200,	1 : 2000	fast alle hellgraublau	—			
1 : 40,	1 : 2000	etwa d. Hälfte ungefärbt, die andere blau	blaue Zelltrümmer			
	Bromthymolblau					
1 : 200,	1 : 2000	ungefärbt	ungefärbte Zelltrümmer			
1 : 40,	1 : 2000	ungefärbt	ungefärbte Zelltrümmer			

2. Färbeverhalten im Ausstrich

a) Ausstrich mit Alkohol behandelt (fixiert)

Farbstoffkonzentration	Färbungszeit (Stunden)	Rote Blutkörperchen	Weiße Blutkörperchen			
			Gelapptkernige		Rundkernige	
			Kern	Plasma	Kern	Plasma
Methylenblau						
1 : 10 000alkoh.[1])	1/4	gelbbräunlich	hellblau	ungefärbt	hellblau	schwach blau
1 : 10 000 wäßrig	1/4	gelbgrünlich	hellblau	ungefärbt	blau	schwach blau
1 : 4000 alkoh.	1/4	verschwommen gelblich	dunkelblau	ungefärbt		—
1 : 2000 alkoh.	1/1	graugrünlich	blau	ungefärbt	dunkelblau	schwach blau
1 : 1000 wäßrig	1/1	grünlich	blau	ungefärbt	inhomog. blau	schwach blau
1 : 1000 wäßrig	1/4	grünlich-hellblau	dunkelblau	ungefärbt	dunkelblau	—
Neutralrot						
1 : 1000 wäßrig	1	hellbraun	teils ungefärbt, teils braun	teils rosa, teils hellbraun		—
			meist schokoladebraune, grobkörnige Trümmerhaufen			—
Chinolinblau						
1 : 1000 wäßrig	1	graugrünlich	—			—
Eosin						
1 : 10 000 alkoh.	1/4	braunrötlich	ungefärbt	rosa Pl., karminrote Gran.		—
1 : 10 000 wäßrig	1/4	rötlich	ungefärbt	karminrote Gran.		—
1 : 4000 alkoh.	1/4	gelbrosa	ungefärbt	ungef. Pl., karminrote Gran.		—
1 : 2000 alkoh.	1/4	rot	ungefärbt	rosa Pl., wenig rote Gran.		—

[1]) alkoh. = 50% Alkohol

Farbstoffkonzentration	Färbungszeit (Stunden)	Rote Blutkörperchen	Weiße Blutkörperchen			
			Gelapptkernige		Rundkernige	
			Kern	Plasma	Kern	Plasma
1 : 1000 wäßrig	1/4	leuchtend rot	höchstens Spur rosa	dunkelrosa	—	
Rose bengale						
1 : 1000 alkoh.	1	satt karminrot	ungefärbt	schwach rosa	—	
Bromthymolblau						
1 : 1000 alkoh.	1	gelb	gelbe Zelltrümmer			

b) Ausstrich mit weiteren Agenzien behandelt

Agens, Farbstoff	Rote Blutkörperchen	Weiße Blutkörperchen			
		Gelapptkernige		Rundkernige	
		Kern	Plasma	Kern	Plasma
Bei 105° C. 1/4 Stunde Einwirkung der Hitze, Färbung 1/2 Stunde					
Methylenblau 1 : 1000	graugrünlich	—		—	
Eosin 1 : 1000	rötlich	—		—	
Trypanblau 1 : 1000	violett	—		—	
Bromthymolblau 1 : 1000	gelb	—		—	
Sulfosalizylsäure 20%. Einwirkung des Agens 1 Stunde, nach Waschen 1/2 Stunde Färbung					
Methylenblau 1 : 1000	grünbläulich	—		—	
Eosin 1 : 1000	rot	—		—	
Trypanblau 1 : 1000	violett	—		—	
Bromthymolblau 1 : 1000	gelb	—		—	
Tannin 1%. Einwirkung des Agens 1 Stunde, nach Waschen 1/2stündige Färbung					
Methylenblau 1 : 1000	—	—		—	
Eosin 1 : 1000	—	—		—	
Trypanblau 1 : 1000	—	—		—	
Bromthymolblau 1 : 1000	—	—		—	
Formalin. Einwirkung des Agens 1 Stunde, nach Waschen 1/2stündige Färbung					
10%, Methylenblau 1 : 1000	—	—		—	
20%, 1 : 1000	z. T. blaue Zelltrümmer				

Agens, Farbstoff		Rote Blutkörperchen	Weiße Blutkörperchen			
			Gelapptkernige		Rundkernige	
			Kern	Plasma	Kern	Plasma
	Eosin					
10%,	1 : 1000	meist ungefärbt, einzelne rosa	rosa		—	
20%,	1 : 1000	—	einzelne große, rosa Zellen			
	Trypanblau					
10%,	1 : 1000	meist schwach	violett		—	
20%,	1 : 1000	violett, einzelne dunkler	einzelne große, schwach violette Zellen			
	Bromthymol-blau					
10%,	1 : 1000	meist hellgelb, einzelne satt gelb	gelb			
20%,	1 : 1000		gelbe Zelltrümmer			
Sublimat 1%. Einwirkung des Agens 1 Stunde, nach Waschen $^1/_2$ Stunde Färbung						
Methylenblau 1 : 1000		graugrünlich	—		—	
Eosin 1 : 1000		rot	rosa			
Trypanblau 1 : 1000		graublau	graublau			
Bromthymolblau 1 : 1000		satt gelb	—		—	

Ergebnisse der Hefeversuche

1. In frischer Hefe finden sich eine geringe Zahl von Zellen, die sich bei Behandlung mit wäßrigen Farbstofflösungen stark blau färben, während die Mehrzahl der Hefezellen ungefärbt bleibt. Es handelt sich offensichtlich um abgestorbene Zellen. Die verschiedenen, von uns untersuchten Farbstoffe tingieren diese Zellen in sehr verschiedenem Grade; bezüglich der Einzelheiten muß auf den Text verwiesen werden. Einzelne Farbstoffe, wie Rose bengale, färben unter gleichen Bedingungen wesentlich mehr, zum Teil alle Zellen, offenbar auf Grund ihrer besonders starken Zellgiftigkeit.

2. Genau wie die von vornherein abgestorbenen Zellen verhalten sich alle Hefezellen, die einer Behandlung durch Trocknung bei 100°, durch kurzes Aufkochen, durch Einwirkung von Alkohol über 40%, von Chloroform in gesättigter Lösung und von Sublimat bis zu 0,01% unterworfen worden waren.

Bei Anwesenheit von etwa 90% Alkohol während der Farbstoffeinwirkung kann Färbung ausbleiben, infolge des besseren Lösungsvermögens der alkoholischen Lösung für den Farbstoff.

3. Die genannten Agenzien zeigen bei schwächerer Intensität ihrer Einwirkung, andere Agenzien bei allen untersuchten Konzentrationen, diesen die Färbbarkeit verursachenden Fixierungseffekt nicht. Dafür beobachtet man aber bei längerer Einwirkung dieser Agenzien eine allmähliche Zunahme der Zahl der abgestorbenen Zellen. Es hängt dies offenbar damit zusammen, daß die abtötende Wirkung dieser Agenzien lange Zeit erfordert und sich dadurch die unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Zellen bemerkbar machen kann.

Die Frage muß dabei offen bleiben, ob es sich bei diesem Absterben um eine unmittelbare Veränderung der Zelle durch das Agens oder um eine mittelbare Einwirkung handelt, so daß die tote Zelle keine besondere für das jeweilige Gift eigentümliche, sondern die allgemeine beim spontanen Tod eintretende Umwandlung aufweisen würde. Für diesen letzteren Modus spricht z. B., daß Tannin zwar ein allmähliches Absterben der Zellen bewirkt, die dann auch in üblicher Weise färbbar sind, daß dagegen selbst 10%ige Tanninlösung nicht imstande ist, in

kurzer Zeit alle Zellen gleichmäßig so zu verändern, daß eine Färbung eintritt.

Bei der Einwirkung von Säure und Lauge sind verschiedene Wirkungsfaktoren zu berücksichtigen:

a) Der Einfluß auf die Färbung als solche, wobei sich (an toten Zellen) die schon bekannte Tatsache zeigte, daß bei saurer Reaktion die Färbung mit sauren, bei alkalischer Reaktion die Färbung mit basischen Farbstoffen gefördert, bzw. ermöglicht wird.

b) Die Veränderung der lebenden Zelle selbst, wobei sich ergab, daß auch die Hefezelle im Bereich von etwa 5 bis 8 p_H leben bleibt und daß sowohl stärkere Säuerung wie stärkere Alkalisierung die Zellen abtötet, so daß sie nach Entfernung der Reaktionsverschiebung wie andere tote Zellen färbbar sind.

c) Eine weitere Veränderung der Zellen durch Säure und Lauge, die dazu führt, daß nach intensiver oder längerer Einwirkung beider Reaktionsrichtungen das färbbare Substrat verschwindet und dadurch die zuvor färbbaren Zellen keinen Farbstoff mehr aufnehmen.

4. Unter den Einwirkungen, die keine Färbbarkeit der Zellen bewirken, sei neben dem schon erwähnten Tannin auch Saponin hervorgehoben.

5. Über den Einfluß physiologischer Faktoren auf die Färbbarkeit der Hefezellen wurde folgendes beobachtet:

a) Der in Kochsalzlösungen untersuchte Einfluß des osmotischen Druckes zeigte eine bemerkenswerte Differenz zwischen hypo- und hypertonischen Lösungen: Hypotonie führte zu einem zunehmenden Absterben mit Auftreten von Färbbarkeit, Hypertonie bewirkte keine Vermehrung der färbbaren Zellen; ob im letzteren Falle die sich nicht färbenden Zellen ihre Lebensfähigkeit erhalten haben, wurde allerdings nicht festgestellt.

b) Während bei überoptimaler Temperatur (37 °) Rohrzuckermedium die Bildung toter, färbbarer Zellen im Vergleich zum Kochsalzmedium nicht sehr wesentlich beeinflußte, zeigte sich bei Zimmertemperatur im Rohrzuckermedium eine verstärkte Färbbarkeit durch die von uns angewandten Farbstoffkonzentrationen, sowohl gegenüber Methylenblau, Eosin, Bromthymolblau, Neutral-

rot; weniger dagegen gegenüber Trypanblau. Es ist wohl nicht anzunehmen, daß im Rohrzuckermedium das spontane Absterben rascher erfolgt; wir nehmen vielmehr an, daß es sich hierbei um eine Schädigung durch den Farbstoff handelt, die infolge rascherer Stoffaufnahme bei der tätigen Zelle im Zuckermedium früher bemerkt wird als im Kochsalzmedium.

Ergebnisse der Blutkörperchenversuche

1. Die roten Blutkörperchen zeigen, frisch untersucht, bei Einwirkung der von uns verwandten Farbstoffkonzentrationen in wäßriger Lösung keine merkliche Färbung; dagegen tritt bei verschiedenen Farbstoffen Hämolyse auf. Auch Änderung der Reaktion zwischen 5 und 8 p_H, Verwendung von Rohrzuckermedium, Einfluß der Brutschranktemperatur, längerer Aufenthalt bei Zimmertemperatur, Trocknung bei niederen Temperaturen, ändert daran nichts. Eine Färbung erfolgt erst bei den bekannten, zu einer Fixierung der Zellen führenden Einwirkungen: Hitzetrocknung, Alkohol über 50%, Sublimat, Phenol, Trichloressigsäure usw. Tannin gibt auch hier kein einwandfreies Färbungsresultat.

2. Weiße Blutkörperchen zeigen ebenfalls nur nach den bekannten groben Fixierungsmitteln die übliche differenzierte Färbbarkeit. Im Gegensatz zu den roten Blutkörperchen ließ sich aber zeigen, daß schon längerer Aufenthalt des Blutes außerhalb des Organismus die Nichtfärbbarkeit der frischen weißen Blutkörperchen aufhebt und nunmehr auch schon in wäßrigem Medium eine von der Färbung fixierter Präparate wesentlich verschiedene, deutliche, wenn auch schwache Färbung, teils des Kerns, teils des Plasmas, teils der im Plasma vorhandenen Granula, eintritt.

Am Schlusse meiner Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. Haffner für Überlassung des Themas und Übernahme des Referats, sowie für seine Beratung bei der Ausführung der Arbeit.

Lebenslauf

Ich, Kurt Spring, wurde am 8. Januar 1906 in Buffalo (USA.) als Sohn des Kaufmanns Heinrich Spring (aus Stuttgart) und seiner Ehefrau Clara, geb. Braumiller (aus Cannstatt) geboren.

Nachdem die Eltern kurz vor Ausbruch des Weltkrieges aus den Vereinigten Staaten nach dem Deutschen Reich zurückkehrten, verbrachte ich die Schulzeit zunächst auf dem Gymnasium, dann auf der Oberrealschule zu Mainz, ab Winter 1919/20 auf der Oberrealschule in Stuttgart bis zur „Einjährigenprüfung". Ein zweijähriger Besuch der Handelsvollschule in Stuttgart bereitete mich auf den Bankberuf vor, dem ich mich dann auch bis Ende 1930 widmete. Neigung und günstige Gelegenheit zum Studium der Medizin bewogen mich jedoch zum Berufswechsel. Das Abitur holte ich im Frühjahr 1933 an der Oberrealschule in Stuttgart nach.

Das Studium der Medizin erfolgte ausschließlich in Tübingen, wo ich im Frühjahr 1939 das Staatsexamen bestand. Nach der einjährigen Medizinalpraktikantenzeit, die ich in der Hauptsache an der Medizinischen Poliklinik und an der Chirurgischen Universitätsklinik in Tübingen verbrachte, wurde mir am 15. April 1940 die Bestallung als Arzt erteilt.

*

Dank und Denkmal gebühren meinem verehrungswürdigen Onkel, Herrn J. F. Schoellkopf, — Dank und Ehre auch meinen Eltern, die mit ihr Bestes taten, um die ärztliche Ausbildung zu ermöglichen.